



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **MMR E SÍNDROME DE LYNCH**

Trabalho submetido por  
**Daniela de Almeida Dâmaso Prates Cravidão**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

**novembro de 2017**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

### **MMR E SÍNDROME DE LYNCH**

Trabalho submetido por  
**Daniela de Almeida Dâmaso Prates Cravidão**  
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por  
**Prof. (a) Doutor (a) Ana Clara Guerreiro de Oliveira Ribeiro**

**novembro de 2017**



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais por terem acreditado em mim, por me darem força todos os dias para lutar pelo meu futuro e por me terem ajudado nos momentos mais difíceis deste meu percurso académico. Sem eles teria sido impossível chegar onde cheguei. Com amor e carinho, um enorme obrigada!

Quero agradecer aos meus colegas que me “aturaram” durante todos estes anos e que, apesar disso, tornaram-se verdadeiros amigos.

De seguida, aos meus queridos amigos que incansavelmente me ouviam a falar da faculdade, do que tinha de estudar e do que já sabia de novo. Que me apoiaram quando precisei e sempre lá estiveram. Obrigada Gordinhos!

Quero agradecer ao meu André, que faz de mim uma pessoa mais feliz todos os dias.

Não poderia deixar de mencionar o meu muito obrigada à Professora Doutora Ana Clara Ribeiro, por me ter aceite como orientanda e por me ter dado o seu apoio e a sua melhor orientação ao longo da realização deste trabalho.

*“Dentro de nós há uma coisa que não tem nome,  
essa coisa é o que somos.”*

José Saramago









## Resumo

A Síndrome de Lynch (SL), também conhecida como síndrome do cancro do cólon hereditário não associado à polipose (HNPCC), é caracterizada por mutações nas linhas germinativas dos genes envolvidos no sistema de reparação do DNA do tipo “mismatch repair” (MMR). É uma patologia de natureza autossômica dominante e é a síndrome que predispõe para o desenvolvimento de cancro colorretal (CCR) e de tumores extra-cólon em idades jovens.

As famílias com a suspeita de SL, são identificadas a partir de critérios específicos de inclusão, como os critérios de Amesterdão, clássicos e modificados, e os critérios de Bethesda revistos e, selecionadas para pesquisa de mutações germinais nos genes MMR.

As alterações resultantes na linha germinativa dos genes MMR, via biológica altamente conservada cujo principal papel é a manutenção da estabilidade genómica, afetam, principalmente, os genes MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2. As perdas de função destes genes têm como resultado a acumulação descontrolada de mutações genéticas resultando numa instabilidade genómica conhecida como instabilidade de microssatélites (MSI).

Atualmente, o diagnóstico tem por base o estudo da história familiar e pessoal, testes de imunohistoquímica, testes genéticos de BRAF e de análise de MSI.

O método de eleição para a monitorização continua a ser a colonoscopia. Outros métodos foram discutidos, como por exemplo estudos de contraste com bário, sigmoiscopia fléxivel e a colonoscopia virtual, pelo que, devido a ausência de consenso e a barreiras custo-efetividade, estes métodos são raramente utilizados.

A cirurgia profilática é o método preventivo mais eficaz, no entanto, terapêuticas profiláticas têm sido sugeridas de modo a restabelecer a normal atividade dos genes MMR e a diminuir a MSI.

São ainda necessários mais estudos, relativamente ao MMR humano e a sua relação com esta síndrome, de modo a possibilitar melhorias na intervenção dos vários profissionais de saúde que contactam com estas famílias.

**Palavras-chave:** cancro colorretal; síndrome de Lynch; “mismatch repair”; instabilidade de microssatélites.



## **Abstract**

Lynch syndrome (LS), also known as non-polyposis hereditary colon cancer (HNPCC) syndrome, is characterized by germline mutations in the genes involved in the DNA mismatch repair (MMR) system. It's an autosomal dominant transmission and is the syndrome that predisposes to the development of colorectal cancer (CCR) and extra-colon tumors at young ages.

Families that are suspected to have SL are identified from specific inclusion criteria, such as the classic and modified Amsterdam criteria and the reviewed Bethesda criteria, being selected for screening on germ mutations in the MMR genes.

The resulting changes in the germline of MMR genes, a highly conserved biological pathway whose main role is the maintenance of genomic stability, mainly affect the MSH2, MSH6, MLH1 and PMS2 genes. The loss of function of these genes results in uncontrolled accumulation of genetic mutations resulting in genomic instability known as microsatellite instability (MSI).

Currently, the diagnosis is based on the study of family and personal history, immunohistochemistry tests, genetic tests of BRAF and MSI analysis.

The method of choice for monitoring is colonoscopy. Other methods have been discussed, such as barium contrast studies, flexible sigmoidoscopy, and virtual colonoscopy. Therefore, due to a lack of consensus and cost-effectiveness barriers, these methods are rarely used.

Prophylactic surgery is still the most effective preventive method, however, prophylactic therapies have been recommended in order to restore normal MMR activity and to decrease MSI.

Further studies are needed on human MMR and its relationship with this syndrome, so as to enable improvements in the intervention of the various health professionals who interact with these families.

**Keywords:** colorectal cancer; Lynch syndrome; mismatch repair; microsatellite instability.



## Índice Geral

Índice de Figuras .....	7
Índice de Tabelas .....	8
Índice de Abreviaturas .....	9
1. Introdução.....	11
2. Mismatch Repair .....	15
2.1. Mecanismo de MMR .....	15
2.2. Complexos do sistema MMR .....	19
2.2.1. Complexos MSH .....	19
2.2.2. Complexos MLH .....	21
2.3. Deficiência do sistema MMR .....	22
2.4. Genes envolvidos na Síndrome de Lynch.....	23
3. Síndrome de Lynch .....	27
3.1. Epidemiologia .....	29
3.2. Prognóstico e factores de risco .....	30
3.3. Métodos de Diagnóstico .....	33
3.3.1. Exames físicos .....	35
3.3.2. Testes de Imunohistoquímica (IHC).....	35
3.3.3. Testes Genéticos .....	36
3.4. Terapêutica.....	40
3.4.1. Monitorização dos portadores de mutações nos genes MMR .....	41
3.4.2. Vigilância de tumores extra-colon.....	41
3.5. Métodos Cirúrgicos.....	42
3.5.1. Vigilância pós-operatória .....	42
3.6. Terapêutica profilática .....	43

4.	Conclusão.....	45
5.	Bibliografia.....	47
6.	Anexos.....	

## Índice de Figuras

Figura 1: Esquema do sistema MMR eucariótico. ....	17
Figura 2: Discriminação de cadeia e funcionamento do sistema MMR.....	19
Figura 3: Localização do gene MLH1.....	23
Figura 4: Localização do gene PMS2.....	24
Figura 5: Localização do gene MSH6. ....	24
Figura 6: Localização do gene MSH2. ....	25
Figura 7: Localização do gene EPCAM. ....	26
Figura 8: Exemplo de hereditariedade autossômica dominante. ....	27
Figura 9: Estratégia para identificação de indivíduos com CCR e mutação num gene MMR. ....	34

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Terminologias utilizadas para a Síndrome de Lynch. ....	12
Tabela 2: Risco de diferentes tipos de cancro em indivíduos com Síndrome de Lynch. ....	13
Tabela 3: Proteínas com atividade funcional no processo de <i>mismatch repair</i> . ....	16
Tabela 4: Variantes da Síndrome de Lynch e genes envolvidos. ....	26
Tabela 5: Relação entre os genes mutados e a frequência de casos de HNPCC. ....	28
Tabela 6: Cancros associados a HNPCC. ....	32
Tabela 7: Marcadores utilizados na avaliação do MSI ....	37
Tabela 8: Protocolo holandês de vigilância de portadores de uma mutação nos genes MMR. ....	40



## Índice de Abreviaturas

CCR – *colorectal cancer* ou cancro colorretal

CTD – *c-terminal domain* ou domínio C-terminal

FAP – *familiar adenomatous polyposis* ou Polipose adenomatosa familiar

HNPCC – *hereditary non-polyposis colorectal cancer* ou Cancro do cólon hereditário não associado à polipose

ICG-HNPCC – *International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer* ou Grupo Colaborativo Internacional do Cancro colorretal não associado à polipose

IHC – *immunohistochemistry* ou imunohistoquímica

MMR – *mismatch repair*

MSI – *microsatellite instability* ou instabilidade de microssatélites

MSI-H – *high microsatellite instability* ou alta instabilidade de microssatélites

MSI-L – *low microsatellite instability* ou baixa instabilidade de microssatélites

NTD – *N-terminal domain* ou domínio N-terminal

NTR – *N-terminal region* ou região N-terminal

Pb – pares de bases

PCNA – *proliferating cell nuclear antigen* ou antígeno nuclear de proliferação celular

RER – reparação por excisão de ribonucleotidos

RFC – *replication factor C* ou fator de replicação C

SL – Síndrome de Lynch

SSB – *single stranded binding protein*



## 1. Introdução

A Síndrome de Lynch (SL), também designada por síndrome do cancro do cólon hereditário não associado a polipose (HNPCC) (Rubenstein *et al.*, 2015), é uma doença hereditária de transmissão autossómica dominante, com penetrância entre 80% a 90% e, sem distinção de género (Freitas *et al.*, 2015). A sigla HNPCC, é atualmente mais utilizada quando nos referimos a indivíduos e/ou famílias que reúnam os critérios de Amesterdão (Brandão *et al.*, 2015). É a síndrome de cancro colorretal (CCR) hereditário mais comum, muitas vezes sub-diagnosticada e com uma prevalência na população geral estimada de 1 em 440 (Freitas *et al.*, 2015), representando 2% a 3% dos cancros colorretais (Rubenstein *et al.*, 2015).

Devido às varias terminologias existentes e às incoerências levantadas entre elas, o termo Síndrome do cancro do cólon hereditário não associado a polipose foi o adotado. “Hereditário” visto que, mesmo que nenhum gene, na altura, tenha sido identificado, existiam sinais de transmissão autossómica dominante. “Não associado a polipose” de modo a enfatizar que não existia um número significativo de pólipos e que, por isso, não poderia ser uma variante da Polipose Adenomatosa Familiar (FAP). E termo “Cancro do cólon” foi incluído devido à sua frequência em praticamente todas as famílias, aparentemente afetadas. Atualmente sabe-se que a SL tem um espectro de tumores extra-cólon (Lynch, 2017).

Mais tarde, de modo a reconhecer as contribuições dos estudos realizados por Henry Lynch, o termo Síndrome de Lynch passou a ser o mais utilizado e reconhecido.

Várias terminologias têm surgido, como mostra na tabela 1, sendo que estas possuem uma aceitação geral, mas não universal (Lynch, 2017).

Tabela 1: Terminologias utilizadas para a Síndrome de Lynch. (Adaptado de Lynch, 2017)

Terminologia	Critérios de Instabilidade de “Mismatch repair” (MMR)
<b>HNPCC</b>	Conhecidos Presente ou não Presente mas sem gene identificado
<b>Câncer de Cólon Familiar “Síndrome X”</b>	Conhecidos Não Não
<b>Síndrome de Lynch</b>	Conhecidos ou não Gene identificado
<b>“Lynch-like”</b>	Presente Mutação não encontrada

A SL é causada por mutações na linha germinativa dos genes do sistema de reparação do DNA do tipo *mismatch repair* (MMR) (Shawki *et al.*, 2016), sendo que, os genes MSH2 e MLH1 são afetados em cerca de 90% dos casos, enquanto que, os restantes 10%, resultam de alterações nos genes MSH6 e PMS2 (Freitas *et al.*, 2015).

O sistema MMR pertence a uma via biológica altamente conservada que desempenha um papel fundamental na manutenção da estabilidade genómica, atuando durante a replicação e recombinação do DNA (Li, 2008), normalmente, nos erros da combinação do par de bases e nas pequenas inserções (Liu *et al.*, 2016). Pelo que, as perdas de função destes genes vão provocar a acumulação descontrolada de mutações genéticas no DNA, um processo que se dá pelo nome de instabilidade de microssatélites (MSI) (Freitas *et al.*, 2015).

Indivíduos com SL, tendem a desenvolver CCR em idades cada vez mais novas (Shawki *et al.*, 2016), em idades inferiores aos 45 anos (Freitas *et al.*, 2015), com uma incidência cumulativa estimada em 80% (Rubenstein *et al.*, 2015), em que o risco de desenvolvimento de CCR ao longo da vida encontra-se entre os 53-69% e 33-52% para homens e mulheres, respetivamente (Shawki *et al.*, 2016). Além de que, existe o risco acrescido de cancro no endométrio, estômago, intestino delgado, pâncreas, trato biliar, ovário, trato urinário e cérebro (Heinen, 2016), ver tabela 2.

Tabela 2: Risco de diferentes tipos de cancro em indivíduos com Síndrome de Lynch. (Adaptado de Vasen *et al.*, 2007)

Cancro	Risco
Colorretal (homem)	28-75%
Endométrio	27-71%
Colorretal (mulher)	24-52%
Ovário	3-13%
Gástrico	2-13%
Trato Urinário	1-12%
Intestino Delgado	4-7%
Cerebro	1-4%
Ducto/vesícula biliar	2%

Em 1991, com a elaboração dos Critério de Amesterdão Clássicos (ver anexos, tabela 1) pelo *International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer* (ICG-HNPCC) foi possível uniformizar a identificação das famílias afetadas (Sousa *et al.*, 2007)

Em 1999, por não incluírem tumores extra-cólon, considerou-se que estes critérios eram restritivos, sendo então criados os Critérios de Amesterdão Modificados (Sousa *et al.*, 2007), ver anexos, tabela 2.

Mais tarde, em 1997, foram propostos os critérios de Bethesda, revistos em 2004 (ver anexos, tabela 3), que possibilitavam o seguimento molecular da HNPCC, através de testes de tumores MSI, imunohistoquímica ou sequenciação de genes (Freitas *et al.*, 2015) uma vez que mais de 90% dos CCR na SL apresentam instabilidade de microssatélites de alto grau (Sousa *et al.*, 2007).

Os critérios de Bethesda revistos são os critérios mais comumente utilizados na identificação de indivíduos com SL, no entanto, muitos médicos especialistas, que lidam com CRC hereditário, confirmam que a SL continua sub-diagnosticada (Heinimann, 2013).

A presente monografia teve como motores de pesquisa as seguintes bases de dados: Pubmed, Google Acadêmico, ResearchGate e Genetics Home Reference.

Para uma pesquisa mais orientada foram selecionadas algumas palavras-chave, em português e em Inglês, como as seguintes: “*lynch syndrome*”, “*mismatch repair*”, “HNPCC”, instabilidade de microssatélites.

É objetivo deste trabalho caracterizar o sistema MMR e a sua relação com a Síndrome de Lynch.

## 2. Mismatch Repair

Com a exposição a produtos exógenos, físicos ou químicos, bem como a metabolitos reativos endógenos, como o oxigénio e o nitrogénio, os danos causados no DNA vão sendo acumulados nas células ao longo do tempo, assim como os erros que ocorrem durante o seu metabolismo normal, onde se inclui a replicação, recombinação e reparação (Li, 2008).

As lesões no DNA, se não forem compensadas, têm potencial para gerar mutações em células somáticas ou germinativas, o que pode alterar o fenótipo celular levando a disfunções e, por fim, a doenças (Modrich, 2016).

De modo a salvaguardar a integridade genómica, as células possuem mecanismos que lhes possibilitam corrigir erros no DNA e prevenir mutações. Um desses sistemas é o MMR, que atua sobre os erros formados no DNA impedindo mutações permanentes após a divisão celular, sendo necessário na paragem do ciclo celular e/ou na morte celular programada, como resposta a certos tipos de erros. Elimina células danificadas, previne a mutagénese a curto prazo e a tumorigénese a longo prazo, pelo que, a sua inativação está associada a cancro esporádicos e hereditários (Li, 2008).

### 2.1. Mecanismo de MMR

O MMR é uma via biológica altamente conservada que apresenta semelhanças significativas entre o MMR humano e o procariótico *E.Coli* e *S.cerevisiae* (Li, 2008), embora as proteínas procariotas sejam homodiméricas e os homólogos humanos heterodímeros, ver tabela 3.

Este mecanismo é melhor entendido em organismos procarióticos, como na *E. Coli*, em que o MMR é iniciado pelo homodímero MutS, responsável pelo reconhecimento de incompatibilidades, seguido pelo MutL, que irá sinalizar o erro, e por fim, o MutH, que irá ativar a endonuclease promovendo a hidrólise da cadeia-filha (Reyes *et al.*, 2015). Estão envolvidos também neste mecanismo os complexos proteicos DNA Helicase II, Exonuclease (I, VII, X e Rec J), proteínas SSB (*single stranded binding*), DNA polimerase III e DNA ligase (Modrich, 2016).

Tabela 3: Proteínas com atividade funcional no processo de *mismatch repair*. (Adaptado de Hsieh *et al.*, 2008)

E.coli	Homólogos Humanos	Funções
MutS	MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ )	Correções simples base-base e de desajustes de inserção/exclusão de uma ou duas bases
MutL	MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ )	Correção de desajustes de inserção/exclusão de uma base ou $\geq 2$
MutH	MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ )	Coordenação dos homólogos MutS aquando das associações incorretas durante a síntese do DNA
	MLH1-MLH2 (MutL $\beta$ )	Função do heterodímero humano é desconhecida Supressão da mutagénese de inserções e deleções na levedura
	MLH1-MLH3 (MutL $\gamma$ )	Supressão da mutagénese de inserções e deleções Participa na meiose
Complexo $\gamma \rightarrow \delta$	Complexo RFC	Recruta PCNA Modula a polaridade da excisão
Grampo $\beta$	PCNA	Interage com os homólogos MutS e MutL Recruta as proteínas do MMR Aumenta a especificidade de ligação “mismatch” de Msh2-Msh6 Excisão e sinalização Síntese do reparo do DNA Re-síntese do DNA
EXO I, EXO X	EXO I	Excisão da dupla cadeia de DNA
DNA pol III	DNA pol $\delta$	Reparo durante a síntese
SSB	RPA	Excisão e síntese do DNA

O MMR inicia-se pela ligação do MutS aos nucleótidos que se encontram inseridos erroneamente na cadeia-filha, formando um complexo MutS-DNA (Lin *et al.*, 2007), ver figura 1. Através de uma reação ATP dependente pelo PCNA-RFC (fator de



replicação C) (Liu *et al.*, 2017), há a interação deste complexo com as proteínas MutL, com a formação de um complexo ternário. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) estimula então a endonuclease presente na subunidade PMS2 do MutL $\alpha$  (Liu *et al.*, 2017), sendo esta a responsável pela clivagem da cadeia danificada, início dos mecanismos de reparação de DNA e consequente substituição de nucleótidos (Lin *et al.*, 2007).

A lacuna, originada pela clivagem, vai atuar como ponto de inserção da helicase, que separa as duas cadeias, seguida das exonucleases cuja função é a deleção dos nucleótidos na região onde se encontra o *mismatch*. O PCNA estimula a re-síntese do DNA, catalisada pela Pol $\delta$  e, por fim, a lacuna é fechada pela DNA Ligase I. (Liu *et al.*, 2017)

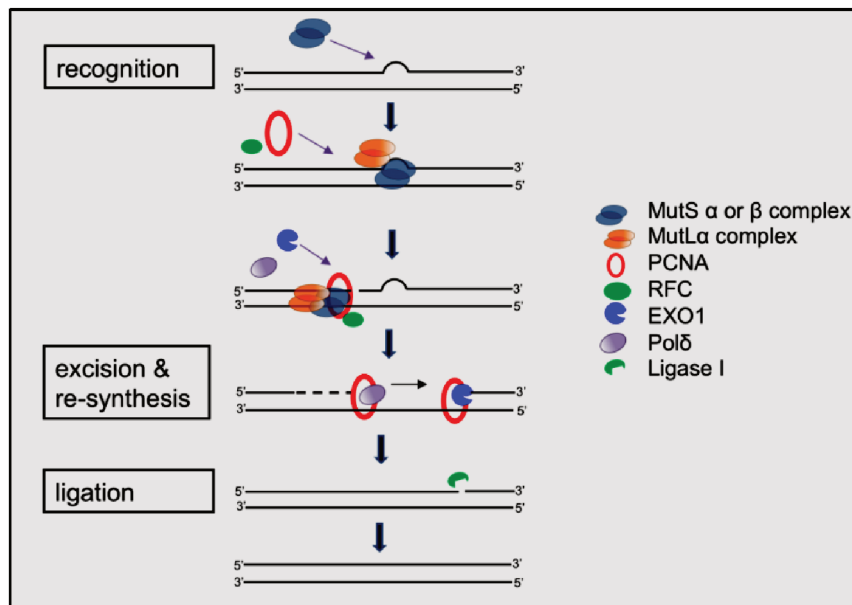


Figura 1: Esquema do sistema MMR eucariótico. (Retirado de Liu *et al.*, 2017)

### Discriminação de cadeia

Uma característica importante do MMR é a discriminação de cadeia de DNA (Reyes *et al.*, 2015). Esta consiste na capacidade de distinção, por parte das enzimas, da cadeia-mãe de DNA da cadeia-filha, de modo a ser possível a correta reparação dos erros de inserção da DNA polimerase durante a replicação (Liu *et al.*, 2017).

Nos procariotas, a assimetria dos locais de hemi-metilação transitória (GATC) é suficiente para uma discriminação precisa. A endonuclease MutH da *E. Coli* envolve, especificamente, a cadeia de DNA não metilada, correspondente ao hemi-metilado da cadeia original, de modo a que esta seja removida. Durante a replicação, devido a

assimetria existente, a cadeia principal ( $5' \rightarrow 3'$ ) é sintetizada continuamente, enquanto que, na cadeia secundária ( $3' \rightarrow 5'$ ) a síntese é descontínua originando pequenos segmentos, designados de fragmentos de Okazaki. Estes fragmentos aumentam o acesso da EXO1 aos locais de incoerência do DNA aumentando também a eficiência do MMR nesta cadeia (Liberti *et al.*, 2014).

Foram propostos, para as células eucarióticas, sinais de discriminação com base nas descontinuidades descritas e a sinalização da cadeia principal recorrendo-se a antigénio nuclear de proliferação celular (PCNA) carregado com fator de replicação C (RFC) (Georgescu *et al.*, 2015). No entanto, a metilação não é o mecanismo pelo qual ocorre esta discriminação nas células eucariotas.

Nas células eucariotas, a replicação da cadeia principal de DNA é feita continuamente pela polimerase  $\epsilon$  (Pol $\epsilon$ ) enquanto que, na cadeia secundária a replicação é descontínua e requer a presença das polimerases  $\alpha$  (Pol $\alpha$ ) e  $\delta$  (Pol $\delta$ ) (Johnson *et al.*, 2016).

Na figura 2 encontra-se esquematizado o modo de atuar do MMR durante a discriminação de cadeia. A replicação da cadeia principal do DNA inicia-se pela catalização da cadeia pela DNA Pol $\epsilon$  na presença do seu fator de processabilidade, o PCNA. A replicação da cadeia secundária do DNA, visto que não é processada de um modo contínuo e requerendo a presença de PCNA e da DNA Pol  $\delta$ , inicia-se nas extremidades 3' dos fragmentos de Okazaki, sintetizados anteriormente pela DNA Pol $\alpha$ . Na extremidade 5' destes fragmentos, são incorporados ribonucleótidos que são posteriormente removidos por reparação por excisão de ribonucleótidos (RER), um processo que resulta em espaços entre estes fragmentos, potenciais locais de entrada para a EXO I e para o sistema MMR (Liu *et al.*, 2017)

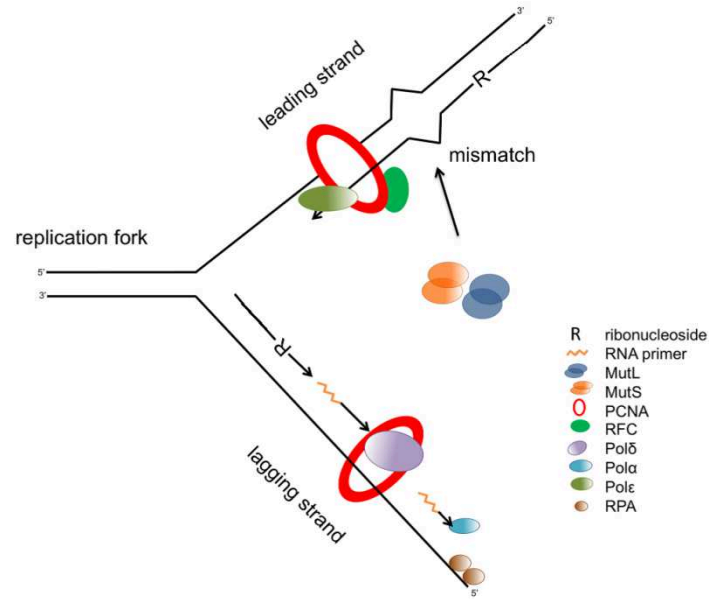


Figura 2: Discriminação de cadeia e funcionamento do sistema MMR. (Retirado de Liu *et al.*, 2017)

## 2.2. Complexos do sistema MMR

### 2.2.1. Complexos MSH

Nos eucariotas, os *mispairs*, são reconhecidos pelos complexos heterodiméricos MSH2-MSH6 e MSH2-MSH3, também conhecidos como, MutS $\alpha$  e MutS $\beta$ , respetivamente (Guillotin *et al.*, 2014).

Estes complexos possuem uma subunidade em comum, o MSH2, e uma subunidade única com especificidades de substrato distintas mas parcialmente sobrepostas, o que por vezes resulta numa redundância genética. Semelhantemente a estrutura assimétrica do homodímero MutS da *E. coli*, cada subunidade do MSH heterodimérico eucariótico, MSH3 e MSH6, possui um papel distinto (Guillotin *et al.*, 2014).

Existem ainda outras três proteínas eucarióticas MSH que não possuem um papel relevante no MMR e, por isso, não irão ser discutidas neste trabalho: MSH1, proteína com ação mitocondrial e sem homólogo mamífero; MSH4 e MSH5, formam um complexo heterodimérico com função nos intermediários que atuam durante a recombinação meiótica em conjunto com o complexo MLH1-MLH3 (Reyes *et al.*, 2015)

**Complexo MSH2-MSH6 (*MutSa*)**

Nos seres humanos, o complexo heterodimérico MSH2-MSH6 é mais abundante que o MSH2-MSH3 em cerca de 10 vezes e é o principal complexo a reconhecer os *mispairs* (Hsieh *et al.*, 2008).

Este complexo forma um dímero assimétrico em que a subunidade MSH6, por possuir uma enorme semelhança com o MutS, contém uma fenilalanina (Phe337 na *S.cerevisiae* e Phe432 nos humanos) num domínio conservado que interage com o DNA errôneo. Consequentemente, mutações que substituem esta fenilalanina impedem o reconhecimento de erros (Reyes *et al.*, 2015).

Tanto MSH6 como MSH2, possuem domínios ATPase que ligam o ATP com diferentes cinéticas e afinidades, pelo que, as mutações que alteram a lisina altamente conservada existente no “motivo Walter A” vão afetar a hidrólise e a dissociação do ATP do DNA. Com a conversão de ADP em ATP, a conformação do complexo vai ser alterada difundindo ao longo do DNA. Devido a esta alteração de conformação, foram identificadas mutações dominantes na MSH6 da *S.cerevisiae* que não afetam a ligação “mispair” mas bloqueiam a alteração conformacional impedindo por vezes a atividade do complexo MLH1-PMS2 (Hsieh *et al.*, 2008).

Estudos sobre o MutS de *S.cerevisiae* e proteínas PCNA revelaram que MSH6 possui uma região N-terminal (NTR), com estrutura globular, que serve de ligação a PCNA e interage mantendo a sua conformação bem definida. A interação entre MSH6 e PCNA necessita da presença de um motivo proteico conservado de interação de PCNA (PIP-box) no NTR do MSH6. Uma PIP-box semelhante encontra-se também representada no NTR do MSH3 mas não no MSH2, pelo que, a transferência do NTR do MSH6 para o MSH2 irá complementar a deleção do mesmo (Modrich, 2016).

A interação deste complexo com PCNA é necessária para recrutar os complexos de reconhecimento de erros do DNA recém-replicado (Reyes *et al.*, 2015).

**Complexo MSH2-MSH3 (*MutSβ*)**

Estudos genéticos e bioquímicos em células humanas e *S.cerevisiae* demonstraram que este complexo tem a capacidade reconhecer e recrutar heterodímeros MHL para os erros de inserção/deleção de bases. No entanto o reconhecimento das falhas é diferente. Em vez de usar um motivo de Phe-X-Glu, onde X é um qualquer resíduo de aminoácido, o domínio I do MSH3 dobra o substrato do DNA e separa as

cadeias no local do erro por inserção de resíduos chave da cadeia lateral. É também conhecido por desempenhar um papel na promoção da expansão de repetições de trinucleótidos, característicos de várias doenças incluindo a Síndrome do X-frágil, doença de Huntington, distrofia miotônica, entre outros (Reyes *et al.*, 2015).

Análises genéticas realizadas em *S.cerevisiae* são consistentes com a necessidade da indução adicional de estabilidade por parte do MSH3 em erros emparelhamento relativamente à inserção/deleção de bases que são intrinsecamente dobradas e separadas da cadeia (Hsieh *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Complexos MLH

Os complexos MLH eucariotas, também heterodiméricos, são denominados MutL $\alpha$ , MutL $\beta$  e MutL $\gamma$  e são formados por, respetivamente, MLH1-PMS2, MLH1-PMS1 e MLH1-MLH3 (Jiricny, 2013).

Nestes complexos, as proteínas possuem domínios N-terminal (NTDs) e domínios C-terminal (CTDs) distintas que se encontram conectadas. Os NTDs contêm um domínio ATPase, que é constituído por quatro locais conservados de ligação ao ATP característicos da família de ATPases GHKL (Dutta *et al.*, 2000). Os CTDs não são conservados na sua sequência primária mas, relativamente à sua estrutura secundária, existe um certo nível de conservação em que possuem domínios de interação com a EXO I, regiões importantes para a dimerização e para a MutL $\alpha$ , (Gueneau *et al.*, 2013).

#### ***Complexo MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ )***

Na *S.cerevisiae*, este é o principal complexo homólogo MutL que atua no MMR, visto que, mutações em MLH2 e MLH3 apenas causam pequenos defeitos no MMR não podendo servir de substitutos do PMS2 (Jiricny, 2013).

Este complexo possui o domínio de endonuclease que reside no CTD do heterodímero (domínio C-terminal da Pol II), que serve como local de ligação de complexos proteicos envolvidos no processamento do mRNA. Foi levantada a hipótese da sua necessidade na sinalização na cadeia simples de DNA, recém-sintetizada, durante o MMR. MLH3 possui um domínio de endonuclease semelhante, estando este ausente na scMLH2 e no hPMS1 (Gueneau *et al.*, 2013).

Foi demonstrado que a MutL $\alpha$  humana é uma endonuclease que hidrolisa covalentemente DNA circular numa reação que é estimulada pela PCNA e pela RFC. No entanto, devido a outras condições reacionais, a endonuclease MutL $\alpha$ , hidrolisa especificamente os segmentos com erros já sinalizados no DNA circular numa reação que necessita da existência de uma base emparelhada incorretamente, ATP, MutS $\alpha$ , PCNA e RFC. Se um sinal pré-existente é necessário para que a MutL $\alpha$  hidrolise o segmento então existem duas hipóteses: (1) a endonuclease representa a sua função no MMR por catalisação dos sítios sinalizados que atuam como locais de iniciação da reação de excisão durante o MMR ou (2) a endonuclease possui um papel ainda desconhecido durante o MMR (Reyes *et al.*, 2015).

#### ***Complexo MLH1-PMS1 (MutL $\beta$ )***

A função deste complexo continua bastante inexplorado, devido ao facto de que a MLH2 da s.c., correspondente ao PMS1 humano, não possuir motivos conservados de endonuclease indentificados nos homologos MutL $\alpha$  e MutL $\gamma$  (Reyes *et al.*, 2015).

#### ***Complexo MLH1-MLH3 (MutL $\gamma$ )***

Acredita-se que o heterodímero Mlh1-Mlh3 desempenhe um papel menor no MMR. O papel deste complexo consiste no processamento de intermediários de recombinação meiótica em conjunto com o complexo Msh4-Msh5 (Zakharyevich *et al.*, 2012). Mlh3 abriga um motivo de endonuclease em seu CTD (Nishant *et al.*, 2008) (Fig. 3) e estudos recentes mostraram que o complexo Mlh1-Mlh3 apresenta atividade de endonuclease. (Rogacheva *et al.*, 2014)

### **2.3. Deficiência do sistema MMR**

A maioria das mutações genéticas é destrutiva para as células, provocando uma perda funcional parcial ou total dos genes.

O DNA quando danificado, e na ausência de reparação, possui um alto potencial de desenvolvimento de neoplasias em células germinativas e/ou somáticas. Estudos bioquímicos e genéticos demonstraram que as alterações no sistema MMR eram as responsáveis pelos defeitos no sistema de reparação do DNA em células cancerígenas (Modrich, 2016).

### ***Instabilidade de Microssatélites***

Os microssatélites são fragmentos de DNA com sequências repetitivas, de dois a seis nucleótidos. A MSI é característica de defeitos nos genes do DNA MMR e é caracterizada pela expansão ou contração de pequenas sequências repetidas de DNA, “*short tandem repeats*”, causadas pela inserção ou deleção de pares de bases repetidas (Munoz, 2017).

Estas sequências são muito susceptíveis a erros aquando da perda de função de um dos genes do MMR o que vai levar à rápida acumulação de mutações de um único nucleótido ao longo de uma simples repetição de microssatélites, visto estes repetirem-se inúmeras vezes. Os cancros que aparecem em células com defeitos nos genes do MMR exibem repetições de microssatélites em números inconsistentes quando comparados com tecido normal, ao que se dá o nome de Instabilidade de Microssatélites, e que pode ser testado através de tecnologias de PCR (Wolf *et al.*, 2013).

Estudos demonstraram que tumores positivos para MSI possuíam defeitos no sistema de reparação do tipo MMR sem que existissem mutações nestes genes. O silenciamento epigenético do MLH1, via hipermetilação da sequência promotora, possui uma forte relação com a diminuição da atividade de reparação. O mesmo não é observado para a hipermetilação do gene MSH2 (Grady *et al.*, 2002).

## **2.4. Genes envolvidos na Síndrome de Lynch**

### ***Gene MLH1***

O gene MLH1 encontra-se localizado no braço pequeno do cromossoma 3 na posição 22.2 (3p22.2), ver figura 3, molecularmente localizado entre os pares de base 36,993,350 a 37,050,846.

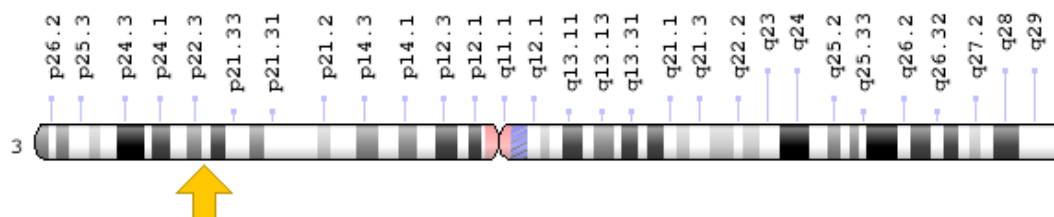


Figura 3: Localização do gene MLH1. (Disponível em : <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1>)

Cerca de 50% dos casos de Síndrome de Lynch encontram-se identificados com mutações neste gene, sendo que, estas são variadas. Quando ocorrem, impedem a produção da proteína MLH1 ou produzem uma versão alterada da mesma que não funciona.

### **Gene PMS2**

O gene PMS2 encontra-se localizado no braço pequeno da cromossoma 7 na posição 22.1 (7p22.1), ver figura 4, molecularmente localizado entre os pares de base 5,970,925 a 6,009,106.

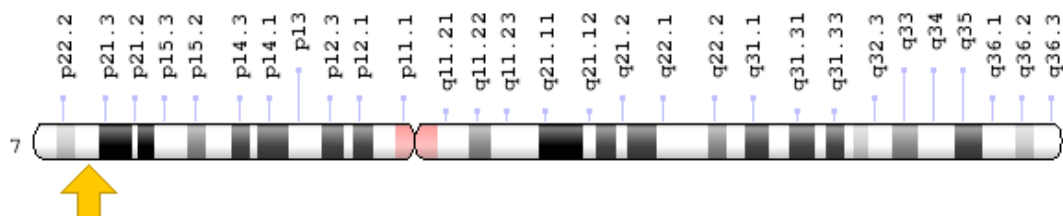


Figura 4: Localização do gene PMS2. (Disponível em : <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PMS2>)

Cerca de 2% das famílias com Síndrome de Lynch possuem mutações neste gene. Quando estas ocorrem, levam à produção da proteína PMS2 inativa ou com um tamanho anormalmente pequeno, que não irá desenvolver uma reparação eficaz durante a replicação levando à acumulação de erros.

### **Gene MSH6**

O gene MSH6, encontra-se localizado no braço pequeno do cromossoma 2 na posição 16.3 (2p16.3), ver figura 5, molecularmente localizado entre os pares de base 47,783,082 a 47,806,953.

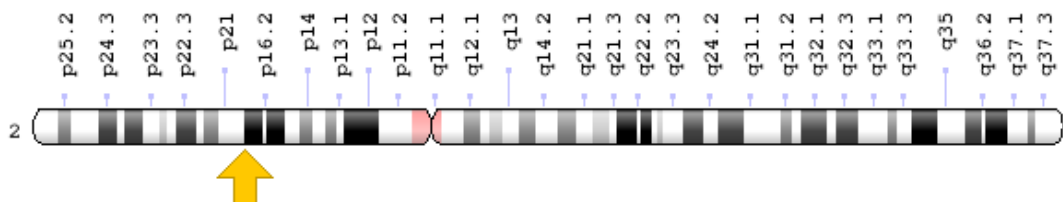


Figura 5: Localização do gene MSH6. (Disponível em : <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH6>)



Cerca de 10% das famílias com SL possuem mutações neste gene. Quando estas ocorrem, levam à produção da proteína MHS2 inativa, com um tamanho anormalmente pequeno ou a uma versão da proteína parcialmente ativa, o que fará com que os erros de replicação não sejam devidamente identificados nem corrigidos.

O cancro endometrial é especialmente comum em mulheres com SL com mutações no gene MSH6.

### ***Gene MSH2***

O gene MSH2, encontra-se localizado no braço pequeno do cromossoma 2 entre as posições 21 e 16.3 (2p21-16.3), ver figura 6, molecularmente localizado entre os pares de base 47,403,067 a 47,634,501.

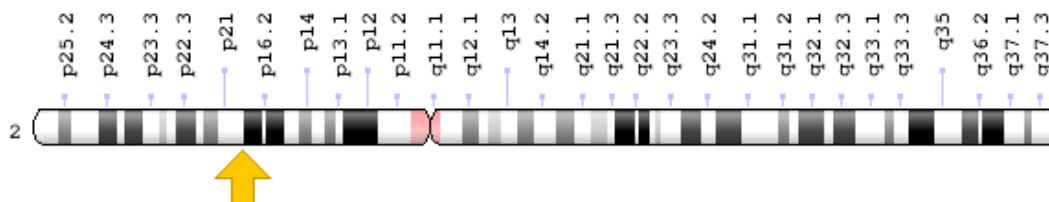


Figura 6: Localização do gene MSH2. (Disponível em : <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2>)

Cerca de 40% dos casos de SL encontram-se identificados com mutações neste gene. Quando estas ocorrem, levam à produção da proteína MHS2 inativa ou com (proteína truncada ou mutação nonsense) um tamanho anormalmente pequeno, o que fará com que os erros de replicação não sejam devidamente identificados nem corrigidos.

### ***Gene EPCAM***

O gene EPCAM, encontra-se localizado no braço pequeno do cromossoma 2 na posição 21 (2p21), ver figura 7, contém a informação para a produção da proteína conhecida como molécula de adesão celular epitelial (EpCAM). Esta é encontrada na membrana que envolve as células epiteliais, onde promove, tal como o seu nome indica, a adesão celular. Possui um domínio intracelular (EpICD), que transmite informação do exterior da célula para o núcleo, e forma complexos com outras proteínas de modo a regular a atividade dos vários genes envolvidos na proliferação, diferenciação e migração celular.

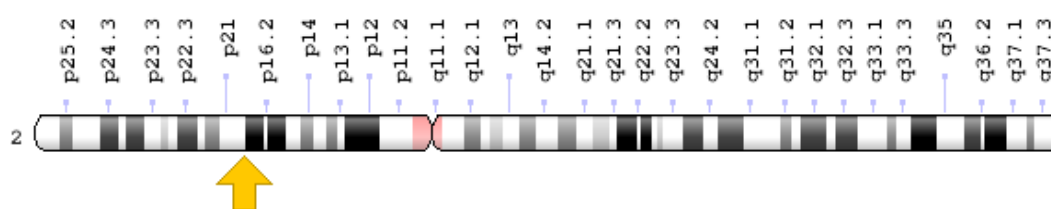


Figura 7: Localização do gene EPCAM. (Disponível em : <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EPCAM>)

Até 6% dos casos de síndrome de Lynch são resultantes da mutação deste gene. A sua localização no cromossoma 2 é imediatamente adjacente à do gene MSH2. Visto que, as mutações do gene EPCAM nesta síndrome resultam na eliminação do codão de terminação, o mRNA resultante será mais longo por constituir tanto o mRNA EPCAM como o MSH2. Esta mutação inativa o gene MSH2, por um mecanismo chamado de hipermetilação do promotor, o que leva à diminuição da produção desta proteína nas células epiteliais.

Na tabela 4 encontram-se apresentadas as variantes da Síndrome de Lynch e os genes envolvidos aquando das suas mutações (Adaptado de Genetics Home Reference, disponível em <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1>, PMS2, Msh2, MSH6 e EPCAM).

Tabela 4: Variantes da Síndrome de Lynch e genes envolvidos. (Adaptado de Genetics Home Reference, disponível em <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1>, PMS2, Msh2, MSH6 e EPCAM)

Variantes da Caracterização			Genes
SL			Alterados
<b>Síndrome de Turcot</b>	Tendência para desenvolvimento de tumores cerebrais (glioblastomas)		MLH1, PMS2
<b>Displasia Epitelial Intestinal</b>	desenvolvimento anormal de células epiteliais nos intestinos com menor capacidade de absorção de nutrientes e fluidos.		EPCAM
<b>Síndrome de Muir-Torre</b>	Risco acrescido de desenvolver adenomas sebáceos, carcinomas cutâneos e ceratoacantomas (geralmente em zonas da pele exposta ao sol).		MLH1, MSH2, MSH6

### 3. Síndrome de Lynch

O HNPCC é a forma mais comum de cancro colorretal hereditário. Representa 2 a 5% de todos os carcinomas colorretais. A transmissão é autossômica dominante, ver figura 8, o que quer dizer que 50% da descendência dos indivíduos afetados herdará um alelo mutado (Rubenstein *et al.*, 2015)..

Mais de 90% de todos os cânceres colorretais em pacientes com HNPCC demonstraram uma alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), o que significa que pelo menos 2 ou mais genes foram mutados em famílias HNPCC ou famílias HNPCC atípicas. O aumento do risco de cancro é devido a estas mutações que quando herdadas degradam a capacidade de auto-reparação do DNA (Kastrinos *et al.*, 2014).

Apresenta-se numa idade mais precoce do que na população em geral sendo caracterizado por um risco aumentado de cânceres extra-cólicos, como o do endométrio, ovário, estômago, intestino delgado, trato hepatobiliar, pâncreas, trato urinário superior, próstata, cérebro e pele (Freitas *et al.*, 2015).

O teste de diagnóstico ao tumor e a cirurgia profilática ajudam a reduzir o risco de morte em pacientes com síndrome de Lynch, sendo que os benefícios destas estratégias afetam principalmente os parentes com mutações associadas a esta síndrome (Munoz, 2017a).

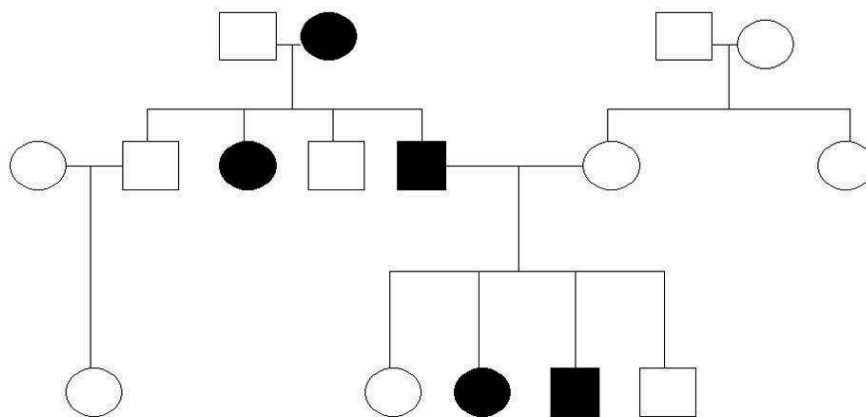


Figura 8: Exemplo de hereditariedade autossômica dominante. (Retirado de Munoz, 2017a).

□ – indivíduos do sexo masculino ○ – indivíduos do sexo feminino ■● – indivíduos afetados

Esta síndrome recebeu o nome do Dr. Henry T. Lynch devido aos trabalhos desenvolvidos, em 1966, em que descreveu a agregação familiar de cancro colorretal com tumores estomacais e endometriais em duas famílias (Lynch, 2017).

Antes do diagnóstico através da análise molecular genética se encontrar disponível, na década de 1990, a única base para estimar o risco familiar de cancro colorretal era uma história familiar abrangente (Wells *et al.*, 2017).

No HNPCC, o fator crítico é o aparecimento de mutações herdadas num dos genes do MMR. Estes genes, normalmente, produzem proteínas que identificam e corrigem *mismatches* que podem ocorrer durante a replicação do DNA. Na HNPCC, a mutação que inativa um dos genes do MMR leva à acumulação de mutações celulares e aumenta fortemente a probabilidade de transformações malignas e cancro (Kastrinos *et al.*, 2014).

Investigadores identificaram sete genes MMR distintos, ver tabela 5, incluindo MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 e PMS2. Outras mutações incluem MSH3 e EXO I (Munoz, 2017a).

Tabela 5: Relação entre os genes mutados e a frequência de casos de HNPCC. (Adaptado de Munoz, 2017a)

Genes	Localização Cromossómica	Frequência de casos de HNPCC
MSH2	2p21-16.3	45–50%
MLH1	3p22.2	20%
MSH6	2p16.3	10%
PMS2	7p22.1	1%
PMS1	2q32.2	Raro
MSH3	5q14.1	Raro
EXO I	1q43	Raro
Outros genes ainda desconhecidos		20-25%

Mutações nas linhas germinais são muitas vezes mutadas mas também surgem espontaneamente ou de novo numa nova geração. Estes indivíduos são muitas vezes identificados apenas após o desenvolvimento de cancro do cólon em idades mais novas (Wells *et al.*, 2017).

Devido à expressão fenotípica da HNPCC consistir na inativação de ambos os alelos, as mutações germinativas de um alelo têm de ser acompanhadas de inativação somática do alelo *wild-tipe*. As inativações podem resultar de deleções, mutações ou

erros de ligação que ocorrem em qualquer lugar ao longo do gene, sendo que, a incapacidade de corrigir os erros de replicação resultam em instabilidade genómica (Kastrinos *et al.*, 2014).

Apesar da ausência de polipose, cancros colorretais associados a HNPCC podem surgir a partir de adenomas do cólon proximal pré-existentes. Indivíduos afetados desenvolvem adenomas à mesma taxa que indivíduos da população em geral no entanto, nos primeiros, é mais provável que haja uma progressão para cancro. A progressão da carcinogénese é mais rápida nestes indivíduos, 2 a 3 anos, do que em indivíduos com adenomas ditos esporádicos, 8 a 10 anos (Munoz, 2017a).

Tumores colorretais sincrónicos, tumores primários diagnosticados com intervalo de até 6 meses de diferença e, tumores colorretais metacrónicos, em que o diagnóstico é num intervalo superior a 1 ano, são mais comuns em pessoas com HNPCC. Indivíduo com mutação HNPCC que não é sujeito a colectomia parcial ou total após o diagnóstico do primeiro tumor como maligno tem um risco estimado de desenvolver um tumor metacrónico no espaço de 10 anos de 30 a 40% e um risco de 5% no espaço de 15 anos (Munoz, 2017a).

### **3.1. Epidemeologia**

#### ***Distribuição relacionada com a idade***

O CCR em indivíduos com HNPCC ocorre em idades mais novas em comparação com a população em geral. A idade média de aparecimento de pólipos é no final da segunda e no início da terceira década de vida. A idade média do aparecimento de CCR é 44 anos em membros de famílias que reúnem os critérios de Amesterdão comparadamente com com as idades 60 a 65 da população em geral (Munoz, 2017a).

#### ***Distribuição relacionada com a raça***

A SL não possuem uma tendência sexual conhecida, mutações étnicas específicas foram observadas nas populações finlandesas e suecas. As taxas de CCR na população judaica Ashkenazi são desproporcionalmente altas, possivelmente as mais altas de qualquer grupo étnico mundialmente. Apesar de, nem a HNPCC nem a FAP clássica serem mais comuns nesta população, comparativamente com a restante população, ambos estão associados a indivíduos com esta herança judaica.

Uma mutação específica no gene MSH2, G1906K, é encontrada em 2-3% de todos os CCR em judeus Ashkenazi com idades inferiores a 60 anos. Um terço destes indivíduos que reuniam os critérios para testes genéticos tinham esta mutação que raramente é encontrada na população em geral. Em indivíduos cujo CCR foi diagnosticado até a idade de 40 anos, 7% eram portadores desta mutação. Por outro lado, a mutação é encontrada em menos de 1% dos indivíduos Ashkenazim em quem o CCR foi diagnosticado após os 60 anos de idade (Munoz, 2017a).

Contrariamente aos relatórios americanos e europeus, o cancro gástrico é mais comum do que o endometrial nas populações asiáticas (japonesa, coreana e chinesa) (Munoz, 2017a).

### **3.2. Prognóstico e factores de risco**

A taxa de sobrevivência a 5 anos em pacientes com CCR é estimada em 60%, em comparação com os 40-50% dos casos esporádicos. Os tumores colorretais positivos para MSI têm características distintas, incluindo uma tendência para surgirem no colon proximal, infiltrado linfocítico, com uma aparência pouco diferenciada, mucinosa ou anelar (Boland *et al.*, 2010). Estão também associados a melhores taxas de sobrevivência (Chen *et al.*, 2017).

Quando comparados com base no estádio, indivíduos com CCR provenientes de famílias que historial de HNPCC possuem um melhor prognóstico do que os indivíduos com CCR esporádico, o que pode ser explicado por fatores imunológicos. Estudos imunológicos em ratos com cancro do cólon têm demonstrado que os tumores influenciam a resposta imune do hospedeiro alterando os receptores das células T. No entanto, a resposta anormal pelas células T foi observada apenas em animais com tumores com vários anos, implicando que o rápido crescimento do tumor, como é visto na HNPCC, pode preservar a resposta imune (Munoz, 2017a).

A melhor evidência de que os exames de colonoscopia são benéficos na prevenção do cancro do cólon em indivíduos com HNPCC foi demonstrada em estudos observacionais de 22 famílias com HNPCC que foram seguidas durante 15 anos. 133 membros destas famílias foram examinados voluntariamente a cada 3 anos e 119 recusaram submeter-se a este exame durante o período do estudo (Shawki *et al.*, 2016).

O CCR foi reduzido em 62% no grupo examinado em comparação com o grupo que não realizou colonoscopia. A redução foi atribuída pelas polipectomias

realizadas no grupo intervencionado, onde não ocorreram mortes associadas ao CCR. No segundo grupo foi observada uma taxa de mortalidade associada ao CCR de cerca de 36% (Shawki *et al.*, 2016).

Pensa-se que cancros do cólon que ocorrem em indivíduos com HNPCC resultam de adenomas, no entanto, estes pólipos adenomatosos provavelmente possuem uma sequência de progressão adenoma-carcinoma diminuída comparativamente com a população em geral (Ladabaum *et al.*, 2011).

Assim, para um portador conhecido de mutações nas linhas germinais de MLH1 ou MSH2, o mais recomendado é uma colonoscopia completa a cada 1-2 anos, com início nas idades de 20 a 25 anos ou, 5 anos antes do primeiro diagnóstico de CCR na família. Após os 35-40 anos, a colonoscopia deve ser realizada anualmente (Ladabaum *et al.*, 2011).

A implementação de exames de CCR de modo a identificar famílias com HNPCC ou SL poderia originar benefícios substanciais com custos aceitáveis, particularmente em mulheres que sejam examinadas regularmente e necessitem de cirurgia profilática. O custo-efetividade destes exames dependem de uma taxa específica entre os parentes em risco para a SL (Ladabaum *et al.*, 2011).

Vários componentes da dieta e do comportamento humano foram propostos como fatores de risco para o CCR, podendo a alteração de alguns comportamentos contribuir na prevenção de CCR. Especialistas diferem na interpretação da evidência para alguns destes componentes. Pouco é sabido se alguns destes fatores são protetivos em indivíduos com risco genético acrescido de CCR (Kastrinos *et al.*, 2014).

Num estudo caso-controlo, a falta de atividade física, a baixa ingestão de alimentos ricos em proteína e de vegetais contribuiu significativamente para um risco de cancro aumentado em indivíduos sem história familiar de CCR. No entanto, naqueles com história familiar, a atividade física e a dieta não foram relacionadas com risco de cancro, apesar do adequado poder estatístico (Munoz, 2017a).

### ***Morbilidade/Mortalidade***

Apesar de nem todos os indivíduos que herdaram o gene para HNPCC desenvolvam CCR, indivíduos com SL possuem um risco de desenvolvimento de cancro do cólon de 70-80%. Destes cancros, dois terços ocorrem no colon proximal (próximo da curvatura ou flexão esplénica) (ver tabela 2 em anexo).

Outros tipos de cancro associados à HNPCC incluem os seguintes, apresentados na tabela 6:

Tabela 6: Cancros associados a HNPCC. (Adaptado de Munoz, 2017a)

	Risco de vida (aos 70 anos)	Idade de Diagnóstico (anos)	
Cancro Endometrial	30-40%	46	Surge primeiro que o CCR
Cancro do Ovário	9-12%	42.5	30% dos tumores surgem antes dos 40 anos
Cancro Gástrico	13% (maior na população asiática)	56	Adenocarcinoma intestinal é a patologia mais reportada
Carcinoma de células de transição	4-10%		Afeta principalmente o trato urinário superior Mutações MSH2 aumentam cancro bexiga
Adenocarcinoma do intestino delgado	1-3%		Ocorre principalmente no duodeno e jejuno
Glioblastoma	1-4%		Síndrome de Turcot

### *Síndrome de Turcot*

Anteriormente considerada uma desordem não associada a FAP, a síndrome de Turcot é clinicamente caracterizada pela presença de adenomas colorretais múltiplos e tumor cerebral primário. Em 1995, foi demonstrado que esta associação pode resultar de dois tipos distintos de alterações das linhas germinativas: uma mutação no gene APC, que representa dois terços dos casos e é responsável pela FAP, e uma mutação no gene PMS2 ou MLH1 do MMR, que representa um terço dos casos. O meduloblastoma, cancro do cerebelo de crescimento rápido, é mais comum em mutações APC, enquanto que o glioblastoma é geralmente encontrado na presença de mutações relacionadas com o MMR (Ozerov *et al.*, 2013).

### *Síndrome Muir-Torre*

Esta variante da HNPCC é caracterizada pela mutação do gene MSH2 e/ou do gene MLH1, embora alguns casos tenham sido descritos com mutações no gene MSH6. Representa muito menos de 1% de todos os casos de CCR hereditário e é caracterizada pelas características típicas da HNPCC e pelo aumento do risco de desenvolver tumores



de glândulas sebáceas, como adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos e queratoacantomas (Bhaijee *et al.*, 2014).

### **3.3. Métodos de Diagnóstico**

O diagnóstico da SL é normalmente realizado mediante um processo com 3 etapas, incluindo a revisão do historial clínico familiar, ensaios a tumores e pesquisa genética, exemplo apresentado pela figura 9 (Vasen *et al.*, 2007).

Um considerável número de indivíduos diagnosticados com CCR possuem historia familiar da doença, no entanto, a maioria dos indivíduos não possuem nenhuma das síndromes conhecidas de CCR. Quando o diagnóstico de HNPCC ou outra síndrome de CCR familiar é considerada, deve ser realizado o estudo da ascendência familiar para cada indivíduo, sendo que, o número de familiares é um dado importante a ser considerado (Kastrinos *et al.*, 2014). Por exemplo, é mais indicativo de HNPCC dois casos de CCR numa família pequena do que o mesmo número de casos numa família numerosa.

Os indivíduos devem ser questionados sobre a ocorrência de CCR ou pólipos em membros da família e sobre outras neoplasias associadas. Os dados familiares que podem indicar HNPCC e levar a uma avaliação mais aprofundada do indivíduo e da sua família são (Munoz, 2017a):

- Múltiplos casos de CCR ou polipos adenomatosos diagnosticados em diferentes gerações;
- Indivíduos afetados com idades inferiores a 50 anos;
- Combinação de tumores relacionados à síndrome noutros órgãos;
- Tumores sincrónicos ou metacrónicos num individuo

São também utilizados critérios clínicos (Brandão *et al.*, 2015), na identificação destes pacientes, como os critérios de Amesterdão I (clássicos), os critérios de Amesterdão II (modernos) e os critérios de Bethesda revistos (ver anexos, tabela 1, 2 e 3, respetivamente).

Quando uma família reúne os critérios de Amesterdão ou Bethesda, é indicado realizar a examinação de células tumorais e, para isso, recorre-se à imunohistoquímica e à pesquisa de instabilidade de microsatélites (Munoz, 2017a).

Na HNPCC ou SL, são utilizados testes às linhas germinativas de modo a identificar mutações nos genes MMR. Amostras de sangue são utilizadas para

identificar mutações através de sequenciação, deleção, análise de duplicação ou de rearranjo. No entanto, estes testes são demorados e com custos elevados pelo que, foram propostas técnicas de seleção de candidatos a estes testes, indivíduos com cancro que têm uma grande probabilidade de serem portadores de HNPCC. Os critérios de Amesterdão são úteis mas falham na identificação de cerca de 30% dos potenciais portadores de SL (Vasen *et al.*, 2007).

Ultimamente, com a combinação do perfil de MSI com os exames de imunohistoquímica (IHC) referentes à expressão dos genes de DNA MMR, tem sido possível a identificação adicional de cerca de 32% dos portadores de SL que apenas com o perfil de MSI não teriam sido identificados. Atualmente esta estratégia combinada é o método mais avançado para a identificação de candidatos a testes genéticos para SL. O próximo passo a considerar seria a elaboração de uma análise sanguínea que pudesse identificar as mutações genéticas da SL ou HNPCC (Vasen *et al.*, 2007).

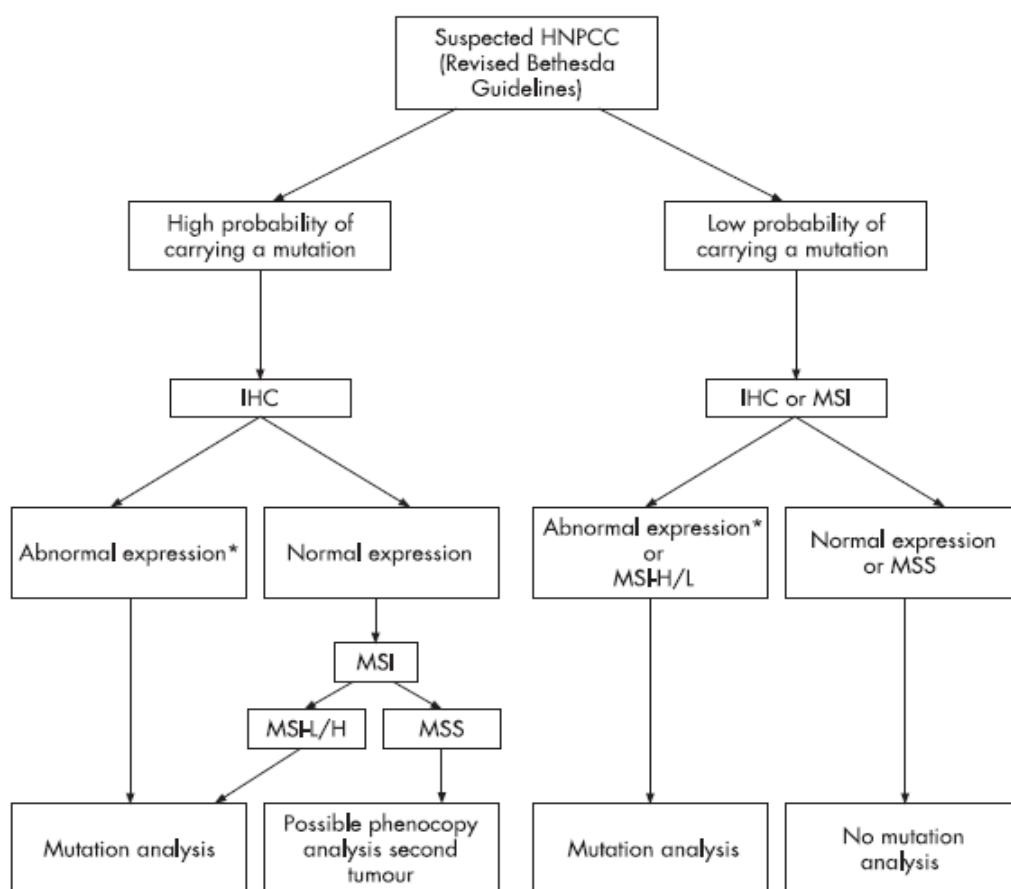


Figura 9: Estratégia para identificação de indivíduos com CCR e mutação num gene MMR. (Retirado de Vasen *et al.*, 2007)

### **3.3.1. Exames físicos**

Apesar da terminologia “hereditário não associado à polipose”, os indivíduos com HNPCC, na verdade, têm pólipos. No entanto, estes tendem a existir num número inferior a 100, enquanto que, noutras formas de CCR hereditário, o número de pólipos é muito superior.

A formação de pólipos inicia-se, normalmente, no final da segunda e início da terceira década de vida. Embora estes cancros sejam frequentemente assintomáticos nas idades mais novas, à medida que o cancro avança existem sinais e sintomas que se podem manifestar como alterações nos hábitos intestinais do tipo obstipação ou diarreia que persistem por vários dias, sangue visível ou oculto nas fezes muitas vezes detetado através da pesquisa de sangue oculto nas fezes, fezes pretas e de difícil defecação, deficiência de ferro sem causa identificável, dores abdominais, fadiga, diminuição de apetite e perda de peso inexplicável (Munoz, 2017b).

### **3.3.2. Testes de Imunohistoquímica (IHC)**

Os testes de IHC, para a HNPCC ou SL, utilizam anticorpos monoclonais de modo a descobrir quais das proteínas de MMR estão presentes nas amostras de tecido.

Os anticorpos são quimicamente marcados de modo a emitirem manchas coloridas quando estes se ligam aos seus homólogos. Amostras de tecido tumoral são testados através da IHC para avaliar as proteínas associadas ao CCR, como a MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. A ausência de uma destas proteínas sugere que tenha existido uma mutação no gene que a produz.

Uma amostra que seja negativa para MLH1 e PMS2 e que, ao mesmo tempo, seja positiva para MSH2 e MSH6 é indicativa de uma mutação em MLH1. Semelhantemente, uma amostra que seja negativa para MSH2 e MSH6 e que ao mesmo tempo, seja positiva para MLH1 e PMS2 é indicativa de uma mutação em MSH2 (Levin *et al.*, 2008).

Dos tumores de portadores de uma mutação germinativa no MSH6, 5% foram detetados com um sinal compatível ao da mutação MSH2, pelo que, se os resultados para o MSH2 são negativos é recomendada a análise de DNA para o MSH6. A perda de expressão por parte do MSH6 é a causa predominante do CCR em idades mais jovens

por deficiência do MMR. Também o cancro endometrial encontra-se associado às mutações MSH6 (Giráldez *et al.*, 2010).

A IHC é especialmente indicativa para mutações do MMR que resultam em mutações do tipo *frame shift*, mutações originadas pela deteção do local de *splicing* do RNA, grandes rearranjos genómicos e, *mismatch* (Levin *et al.*, 2008).

### 3.3.3. Testes Genéticos

#### *Análise de Instabilidade de Microsatélites (MSI)*

Primeiramente descrita em 1993, a MSI é um fenómeno encontrado no DNA de células de CCR mas não na mucosa colorretal normal adjacente de indivíduos com mutações de MMR. Mais de 90% dos tumores HNPCC e 15% dos CCR esporádicos exibem MSI (Wells *et al.*, 2017).

Este teste é usado com o intuito de detetar falhas no mecanismo de DNA MMR que ocorrem durante a replicação do DNA. Estas falhas levam ao aumento das variações das sequências simples e repetitivas ao longo do genoma. A presença de instabilidade indica dano na replicação do DNA e no sistema de reparação o que pode ser causado por mutações dos genes MMR (Losso *et al.*, 2012).

Em 1992, três estudos foram publicados onde foi reconhecida a ligação do MSI à Síndrome de Lynch. O primeiro observou a preponderância existente de cancro proximal e o aumento da sobrevivência em doentes com SL quando comparados com casos esporádicos (Thibodeau *et al.*, 1993), o segundo referiu-se ao MSI como fenótipo de erro de replicação RER (Peltomäki *et al.*, 1993) e, o terceiro ligou o locus que mais tarde ajudaria a identificar os genes responsáveis do MMR (Aaltonen *et al.*, 1993).

Em 1997, a MSI foi definida como uma mudança de qualquer comprimento devido à inserção ou deleção de unidades repetitivas num microsatélite dentro de um tumor, quando comparado ao tecido normal (Wolf *et al.*, 2013). Foram também propostos marcadores específicos, ver a tabela 7, para a avaliação do MSI onde estão incluídos BAT25, BAT26, D5S346, D2S123 e D17S250 (Losso *et al.*, 2012).

Tabela 7: Marcadores utilizados na avaliação do MSI . (Adaptado de Losso et al., 2012)

<b>Microssatélites</b>	<b>Localização</b>	<b>Tamanho</b>	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
BAT25	Gene c-Kit (4q12)	110-130 pb	5' - TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT - 3'	5' - TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC - 3'
BAT26	Gene MSH2 (2p)	100-120 pb	5' - TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC - 3'	5' - AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C - 3'
D5S346	Gene MSH2 (2p)	200-230 pb	5' - AAA CAG GAT GCC TGC CTT TA - 3'	5' - GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC - 3'
D2S123	Gene APC (5q22-23)	100-130 pb	5' - AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T - 3'	5' - ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG - 3'
D17S250	Gene BRCA1 (17q12-11.2)	140-170 pb	5' - GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT - 3'	5' - GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC - 3'

Se não forem encontradas alterações, ou seja, tumores sem marcadores positivos, o tumor é classificado como MSS (microsatellite stable). No caso de dois ou mais marcadores forem positivos (Rodriguez-Bigas *et al.*, 1997), ou pelo menos 30% dos marcadores mostrarem instabilidade (Munoz, 2007a) , o resultado da análise é classificado como MSI-high (MSI-H). Nos casos em que apenas um marcador é positivo ou menos de 30% dos marcadores demonstram instabilidade, o tumor é classificado de MSI-low (MSI-L) (Rodriguez-Bigas *et al.*, 1997), ver anexos, tabela 4.

A perda da expressão in vitro dos complexos MLH1 e MSH2 foi frequentemente encontrada em células tumorais, apresentando resistência a agentes químicos. A caracterização da tolerância a agentes alquilantes por células deficientes em MMR tem direcionado implicações importantes nos processos quimioterápicos em pacientes com HNPCC e MSI (Peltomäki, 2003).

Carcinomas em portadores MSH6, particularmente os carcinomas endometriais, têm-se demonstrado com um fenótipo MSS portanto, se é obtido um

fenótipo MMS, deve ser realizado um teste IHC para o MSH6. Perto de 90% das mutações MLH1 E MSH2 resultam de um fenótipo MSH-H, enquanto que cerca de 10% das mutações MLH6 podem resultar de fenótipos MSI-L ou MSS (Wolf *et al.*, 2013).

Embora a maioria das regiões de microssatélites estejam localizadas em regiões não codificadas do genoma, algumas encontram-se localizadas em regiões codificadas de genes envolvidos na regulação do crescimento celular, como por exemplo, o receptor beta tipo II do fator de transformação do crescimento (TGF), e na apoptose celular, como é o caso do gene BAX (acelerador da apoptose celular programada). Defende-se que alterações nestes importantes genes reguladores sejam as responsáveis pela taxa de aceleração de transformação maligna observada na HNPCC (Levin *et al.*, 2008).

A sensibilidade da análise de MSI é de cerca de 93% em relação á detecção de deficiências no sistema MMR em portadores de mutações de MMR. No entanto, este teste não pode ser utilizado de modo a prever quais dos genes MMR possuem mutações sendo necessário recorrer a técnicas de IHC, que possuem a vantagem de poderem indicar qual o gene MMR mais apropriado para análise do DNA(Wolf *et al.*, 2013).

Resultados de testes MSI publicados pela Associação Americana de Gastroenterologia (AGA) revelaram que a maior percentagem de resultados MSI-H foram encontrados em famílias que reuniam os critério de Amesterdão I, seguidos por indivíduos com CCR que foram diagnosticados antes dos 35 anos de idade. Para os testes genéticos, os resultados foram semelhantes.

Na generalidade, os testes genéticos deveriam ser facultados quando a suspeita clínica de HNPCC se encontra bem estabelecida. É geralmente aceite que indivíduos que reúnam os critérios de Amesterdão ou os critérios de Bethesda de 1997 sejam candidatos a teste (Munoz, 2017a).

As novas guidelines recomendam a análise de MSI ou IHC de tumores de indivíduos de alto risco como estratégia inicial preferida de diagnóstico, seguida de detecção de mutações MLH1 e MSH2 através de testes germinais para aqueles com tumores MSI-H ou tumores com perda de expressão de uma das proteínas resultantes dos genes MMR. Os testes às mutações da linha germinativa MSH6 deveriam ser consideradas aquando dos testes MSI-H (Wolf *et al.*, 2013).

### **Teste de BRAF**

O teste ao BRAF auxilia a distinção entre HNPCC e cancro esporádico através da presença da mutação V600E no gene BRAF (Molinari *et al.*, 2014).

Este gene contém informação para produzir uma proteína que atua na sinalização do exterior para o núcleo da célula, pertence à via RAS/MAPK que é responsável pela proliferação, diferenciação, migração e apoptose celular, pelo que, quando mutados, têm potencial de fazer com que as células normais se tornem cancerosas, pertencendo assim a uma classe de genes conhecidos como oncogenes (Ladabaum *et al.*, 2011).

A perda esporádica da expressão da proteína MLH1 pode resultar da hipermetilação do promotor do gene MLH1. Por isso, tumores que demonstram a perda da proteína MLH1 e não apresentam mutações V600E no BRAF ou hipermetilação são suspeitos de estarem associados à SL ou HNPCC (Molinari *et al.*, 2014).

As preocupações relacionadas com os testes genéticos englobam a dificuldade emocional, independentemente dos resultados (Weissman *et al.*, 2011); após o diagnóstico, a vigilância e as recomendações do aconselhamento genético devem ser estendidas a todos os parentes disponíveis de primeiro e segundo grau; os custos associados ao rastreio e prevenção não abrangidos pelo seguro de saúde, em indivíduos com mutações; a discriminação do empregador ou do provedor de seguros com base nos resultados de testes genéticos.

Benefícios dos exames genéticos (Rodriguez-Bigas *et al.*, 1997):

- Podem permitir uma avaliação mais precisa do risco de cancro, isto porque, se uma mutação for devidamente identificada, estes exames e uma triagem precoce podem ser realizados e oferecidos tanto ao indivíduo como a outros membros da família em risco.
- A vigilância e gestão do doente podem ser realizadas para indivíduos com mutações identificadas.
- Indivíduos com resultados negativos evitam estas medidas.
- Não envolve nenhum risco físico além da amostragem de sangue de rotina.

### 3.4. Terapêutica

A Tabela 8 resume as guidelines para a vigilância de famílias com SL recomendadas pela Sociedade Internacional de Tumores Hereditários Gastrointestinais, The International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumours (Vasen *et al.*, 2007). Este protocolo é indicado em famílias com mutações MMR identificadas, e também em famílias com CRC e outros cancros relacionados com evidência de mutações MMR, por exemplo, pela presença de MSI ou perda de expressão em tumores (Vasen *et al.*, 2007), com exceção das famílias de pacientes com características causadas por hipermetilação de MLH1 (Vasen *et al.*, 2014).

Tabela 8: Protocolo holandês de vigilância de portadores de uma mutação nos genes MMR. (Adaptado de Vasen *et al.*, 2007)

	<b>Limite de idade (inferior)</b>	<b>Exames</b>	<b>Intervalo (anos)</b>
<b>Síndrome de Lynch</b>	20-25	Colonoscopia	1-2
	30-35	Exames ginecológicos, exames transvaginais, biópsia por aspiração	1-2
	30-35	Gastroduodenoscopia (história de cancro gástrico familiar)	1-2
	30-35	Ultrassom abdominal, análise de urina, citologia urinária (história de cancro do trato urinário)	1-2
<b>Famílias com CCR sem evidência de MSI (mas que reunem os critérios de Amesterdão)</b>	45-50 ou 5-10 anos antes da idade de diagnóstico do primeiro caso de CCR na família	Colonoscopia	3-5



Os objetivos destes seguimentos são reduzir a mortalidade através da deteção de cancros pré-sintomáticos e em fase inicial e, reduzir a incidência através da identificação e remoção de adenomas pré-cancerígenos (Wells *et al.*, 2017).

### **3.4.1. Monitorização dos portadores de mutações nos genes MMR**

As principais indicações para se realizar rastreios do cólon incluem indivíduos que possuem mutações genéticas MMR nas linhas germinais, indivíduos cujos parentes afetados que recusam ou não se encontram disponíveis para realizar exames genéticos e, indivíduos assintomáticos em risco, para os quais o exame genético é inadequado, por exemplo, familiares com tumores MSI-H e exames genéticos inconclusivos (Munoz, 2017b).

#### *Colonoscopia*

A colonoscopia foi adicionada às guidelines de prevenção como uma nova opção à examinação do cólon em 1997. Atualmente, é considerada como método principal em indivíduos com HNPCC. A evidência que suporta este método é derivada aos dados que mostram uma diminuição da taxa de mortalidade em doentes com CCR que foram submetidos a remoção de adenomas por colonoscopia. Adicionalmente, este método é mais custo-efetivo quando comparado com outras estratégias de vigilância, como por exemplo, estudos de contraste com bário, sigmoiscopia flexível ou colonoscopia virtual (Wells *et al.*, 2017).

### **3.4.2. Vigilância de tumores extra-cólon**

Os exames de IHC e MSI podem ser uteis em portadores de uma mutação dos genes MMR, conforme o proposto no protocolo holandês.

Mulheres com SL são recomendadas para a realização de um exame pélvico anula, exame ultra-sonográfico e biópsias ao útero, por volta dos 30 ou 35 anos de modo a detetar cancro uterino. Recomenda-se também um exame anual de despiste de cancro endometrial e do ovário, a partir dos 20 ou 30 anos (Wells *et al.*, 2017).

Foi demonstrado que o método de endoscopia de rotina superior não é considerada benéfica nos casos de SL (Vasen, 2013), no entanto o seu uso pode ser

justificável em parentes de alto risco (Hampel *et al.*, 2006). O Grupo Colaborativo Internacional sobre o HNPCC recomenda um procedimento endoscópico a cada 1-2 anos a partir dos 30 anos de idade para indivíduos com risco de cancro gástrico associado ao HNPCC. A maioria destes estudos foram realizados no continente asiático onde as taxas de cancro do estomago são bastante elevadas (Munoz, 2017b).

O rastreio do cancro do estômago pode então ser recomendado a pessoas idosas com gastríte atrófica ou anemia perniciosa, indivíduos com gastríte parcial, diagnóstico de adenomas esporádicos, FAP, HNPCC e/ou populações étnicas imigrantes de países com altas taxas de incidência de carcinoma gástrico (Wells *et al.*, 2017).

Famílias com história familiar de tumores no trato urinário, em que os exames são considerados benéficos, devem submeter-se a ultra-sonografia, citoscopia e citologia urinária a cada 1-2 anos a partir dos 30-35 anos de idade (Wells *et al.*, 2017).

Atualmente, ainda não existem recomendações indicadas específicas para o cancro hepatobiliar e, em geral, não são recomendados exames de rastreio do fígado e do trato biliar. Foram no entanto sugeridos ultra-sonografias transabdominal da árvore biliar e testes de função hepática (Munoz, 2017b).

### **3.5. Métodos Cirúrgicos**

A única maneira de prevenir completamente o desenvolvimento de cancro no cólon ou tratar um cancro já existente é a remoção total do cólon (Wells *et al.*, 2017). As três cirurgias mais realizadas para o tratamento do HNPCC incluem a colectomia subtotal com anastemose ileorectal, colectomia total com tração ileoanal e colectomia total com ileostomia. A segunda, acompanhada de vigilância retal pós-cirúrgica, é recomendada quando há o desenvolvimento de CCR em indivíduos com HNPCC, podendo ser também considerada para profilaxia em portadores de mutação dos genes MMR (Munoz, 2017b).

#### **3.5.1. Vigilância pós-operatória**

A vigilância pós-operatória é indicada após a ressecção curativa em pacientes com HNPCC devido taxas elevadas de cancro metacrónico, estimado em 40% a 10 anos e 72% a 40 anos, dependendo do comprimento do cólon remanescente após cirurgia. A sigmoidoscopia de vigilância é recomendada a cada 1-2 anos após a colectomia subtotal

e a colonoscopia de vigilância é recomendada a cada 1-2 anos após a colectomia parcial (Munoz, 2017b).

### **3.6. Terapêutica profilática**

Estudos observacionais em indivíduos com risco mediano sugerem que a utilização de alguns medicamentos, suplementos alimentares e também agentes antioxidantes podem prevenir o desenvolvimento de CCR. No entanto, ensaios controlados randomizados sobre o uso de agentes quimio-preventivos são limitados, e apenas alguns estudos têm selecionado especificamente indivíduos com predisposição herdada para CCR e portanto, a evidência não foi convincente de modo a ser recomendada em indivíduos com HNPCC (Munoz, 2017b).

#### *Anti-inflamatórios não Esteroides*

Estudos controlados randomizados demonstraram que o celecoxib, AINE, induziu a regressão de adenomas em indivíduos com FAP. Dados pré-clínicos suportam a segurança e eficácia dos inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) em paciente com FAP pelo que o uso de celecoxib foi aprovado, pela US Food Drug and Administration (FDA), como adjuvantes em adenomas colorretais em indivíduos com FAP (Lang *et al.*, 2017).

Apesar de se ter demonstrado que a expressão da COX-2 ocorre em pacientes com adenomas e CCR, a sua expressão pode não ser tão pronunciada em indivíduos com HNPCC, em comparação a FAP, isto devido aos polimorfismos nos genes dos proteínas metabolizadores que podem contribuir para as variadas respostas aos AINE's (Lang *et al.*, 2017).

Relativamente ao ácido acetilsalicílico, aspirina, estudos prospetivos demonstraram uma redução significativa de CCR em profissionais de saúde que tomavam regularmente aspirina (Drazen, 2007). Um estudo controlado randomizado sobre o efeito da aspirina no CCR, de 2011, demonstrou uma redução do risco a longo prazo de cancro do intestino em cerca de 60%, em pessoas com história familiar da doença. Foram estudados 861 indivíduos com SL que tomaram 600 mg da aspirina por dia durante dois anos, com um seguimento médio de 55,7 meses. 18 dos 427 doente, atribuídos aleatoriamente à toma de aspirina, desenvolveram CCR em comparação com os 30 dos 434 pacientes do grupo placebo. Estes dados demonstram a necessidade de

estudos mais aprofundados de modo a determinar a dose e a duração ideais para diferentes grupos de pessoas. (Burn et al., 2011).

### *Ácido Fólico*

Num estudo observacional de Cole *et al.*, 2007, a utilização de suplementos de ácido fólico, com uma duração superior a 15 anos, foi associada a uma taxa de CCR inferior em cerca de 75%. Este estudo foi realizado em mulheres com história familiar de cancro do cólon. Uma hipótese defende que devido à necessidade da utilização de folatos durante a síntese do DNA, concentrações subótimas podem causar anormalidades na síntese ou durante a sua reparação.

### *Cálcio*

Investigações sugeriram que o cálcio forma ligações com os ácidos biliares no lúmen intestinal, inibindo os seus efeitos carcinogénicos. Um ensaio controlado randomizado com suplementação de cálcio, com uma dose diária de 1200 mg durante 4 anos, reduziu o risco de adenomas recorrentes em cerca de 19%. Estes resultados podem não ser aplicados a indivíduos com risco genético acrescido de CCR (Grau *et al.*, 2003).

### *Estrogénios*

A toma de estrogénios está associada com uma menor incidência de CCR, no entanto, esta informação não tem em consideração indivíduos com risco genético aumentado de CCR. Não obstante que, a longo termo, o efeito da combinação de estrogénios com progestina no CCR em mulheres em fase pós-menopausa não mostrou benefício clínico evidente (Munoz, 2017b).

## 4. Conclusão

A descoberta de que os defeitos no sistema MMR possuem um papel causal na HNPCC, e em muitos outros cânceros esporádicos com risco de MSI, resultou no aumento da sua relevância clínica, tornando-se necessários mais estudos da função MMR em células eucarióticas. Levou também a pesquisas intensivas e à melhor compreensão dos variados papéis biológicos desempenhados pelo sistema MMR relacionando-os com métodos de prevenção e terapêutica (Li, 2008).

Visto que o papel principal do sistema MMR é a melhoria da fidelidade da replicação, através da correção de desajustes base-base associados à replicação ou erros de identificação, e os seus papéis secundários importantes na modulação da recombinação do DNA e na acessibilidade à sinalização do dano do DNA, torna-se bastante claro que os erros que possam existir neste sistema proporcionam oportunidades de iniciação de processos carcinogênicos (Li, 2008).

São necessárias novas abordagens ou alternativas para pacientes com ou sem MSI, como por exemplo terapia genética direcionada, que poderia restaurar seletivamente a sensibilidade ao fármaco nestas células ou tratamento com agentes que estimulam a apoptose em células tumorais.

Pesquisas adicionais sobre mecanismos que eliminam seletivamente células com deficiência de MMR também são justificadas devendo incluir uma pesquisa mais avançada sobre os mecanismos moleculares da MMR eucariótica. Compreender estes mecanismos, apoiará os esforços para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas adequadas a pacientes com HNPCC ou outros tumores deficientes em MMR MSI-positivos.

O aumento do conhecimento em relação a esta síndrome possibilita uma melhoria do diagnóstico da SL. Atualmente, os instrumentos de triagem utilizados são, o estudo detalhado da história familiar, as características patológicas e clínicas do tumor e o recurso a testes genéticos. O diagnóstico clínico e molecular é fundamental para a identificação de doentes com SL, devido à presença de um risco aumentado nestes doentes em relação à população em geral, para o desenvolvimento de variados carcinomas. Por possuir uma transmissão hereditária autossômica dominante, a probabilidade da descendência ser portadora da mutação é de 50%, pelo que, a promoção de rastreios intensivos de prevenção e tratamento podem levar à redução significativa do risco de desenvolvimento de neoplasias (Ashton-Prolla *et al.*, 2005).

A vigilância por colonoscopia periódica tem revelados resultados positivos na detecção de CCR em estádios precoces reduzindo o risco de CCR em 62%, bem como, a redução significativa da mortalidade associada (Vasen *et al.*, 2007).

A compreensão da base genética da SL, tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos, tem-se tornado essencial para a correta abordagem aos doentes com SL através da realização de exames moleculares ao tecido tumoral, tais como, a análise da MSI e o teste de IHC, seguidos da realização de uma análise de mutações genéticas na presença de evidência de mutações germinativas.

Atualmente, os testes MSI e IHC são utilizados para a seleção de indivíduos que devem realizar uma análise da mutação genética, no entanto, apesar de serem métodos válidos, ainda não existem dados significativos. Devido às várias mutações existentes, existem dificuldades na interpretação dos resultados dos testes genéticos, falsos positivos e negativos. Apesar das abrangentes orientações dos critérios de Bethesda, indivíduos com mutações germinativas e MSI continuam sem ser identificados.

Apesar da falta de consenso, têm sido realizados vários estudos de modo a elaborar estratégias quimiopreventivas que diminuam a MSI, como a utilização de ácido acetilsalicílico, AINE's e agentes quimioterápicos e; que consigam restabelecer a normal atividade dos genes reparadores de DNA (Niv, 2007).

Também ao nível do tratamento cirúrgico do CCR, as opiniões são algo divergentes. Existe ainda discordância na escolha do tratamento cirúrgico do CCR. Alguns defendem que se deve realizar colectomia parcial com seguimento por endoscopia periódica, enquanto outros defendem a realização de colectomia total com anastomose ileorectal, já que a probabilidade de recidiva é alta e a colonoscopia não é um método de rastreio 100% eficaz (Ashton-Prolla *et al.*, 2005).

Apesar de todos os avanços realizados nesta área, são necessários mais estudos, relativamente ao MMR humano, à terapêutica genética e, à sua relação com esta síndrome, de modo a auxiliar os profissionais de saúde envolvidos, na melhoria dos cuidados de saúde a prestar a estas famílias. É também necessário, com auxílio das associações responsáveis, dar a conhecer à população os fatores de risco que predis põem a esta síndrome, assim como, as técnicas disponíveis de prevenção e diagnóstico.

## 5. Bibliografia

Aaltonen, L., Peltomäki, P., Leach, F., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J., ... Chapellet, A. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260(5109), 812–816. doi:10.1126/science.8484121

Ashton-Prolla, P. e, Prolla, J. (2005). Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: Hereditary predisposition, diagnosis and prevention. *Arquivos de Gastroenterologia*, 42(2), 99–106. doi:10.1590/S0004-28032005000200007

Bhaijee, F. e, Brown, A. S. (2014). Muir-Torre Syndrome. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 138(12), 1685–1689. doi:10.5858/arpa.2013-0301-RS

Boland, C. e, Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087. doi:10.1053/j.gastro.2009.12.064

Brandão, C. e, Lage, J. (2015). Management of Patients with Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Portuguese Journal of Gastroenterology*, 22(5), 204–212. doi:10.1016/j.jpge.2015.06.003

Burn, J., Gerdes, A., Macrae, F., Mecklin, J., Moeslein, G., Olschwang, S., ... Bishop, T. (2011). Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet*, 378(9809), 2081–2087. doi:10.1016/S0140-6736(11)61049-0

Chen, W., Swanson, B. e, Frankel, W. L. (2017). Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagnostic Pathology*, 12(24), 1–12. doi:10.1186/s13000-017-0613-8

Cole, B., Baron, J. e, Sandler, R. (2007) Folic Acid for the Prevention of Colorectal Adenomas - A Randomized Clinical Trial. *Jama*, 297(21), 2351-2359. doi:10.1001/jama.297.21.2351

Drazen, J. M. (2007). Aspirin and Colon Cancer — Targeting Prevention?. *The New England Journal of Medicine*, 356(21), 2195–2198. doi:10.1056/NEJMe078086

Dutta, R. e, Inouye, M. (2000). GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(1), 24–28. doi:10.1016/S0968-0004(99)01503-0

Freitas, I., Campos, F., Alves, V., Cavalcante, J., Carraro, D., Coudry, R., ... Ribeiro, U. (2015). Proficiency of DNA repair genes and microsatellite instability in operated colorectal cancer patients with clinical suspicion of lynch syndrome. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 6(6), 628–637. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2015.089

Georgescu, R., Langston, L. e, Donnell, M. O. (2015). A proposal: Evolution of PCNA's role as a marker of newly replicated DNA. *DNA Repair*, 29, 4–15. doi:10.1016/j.dnarep.2015.01.015

Giráldez, M. D., Balaguer, F., Bujanda, L., Cuatrecasas, M., Muñoz, J., Alonso-Espinaco, V., ... Castellví-bel, S. (2010). MSH6 and MUTYH Deficiency Is a Frequent Event in Early-Onset Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*, 16(22), 5402–5413. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-1491

Grady, W. e, Markowitz, S. (2002). Genetic and epigenetic alterations in Colon Cancer. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 3(1), 101–128. doi:10.1146/annurev.genom.3.022502.103043

Grau, M., Baron, J., Sandler, R., Haile, R., Beach, M., Church, T. e, Heber, D. (2003). Vitamin D, Calcium Supplementation, and Colorectal Adenomas: Results of a Randomized Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(23), 1765–1771. doi:10.1093/jnci/djg110

Gueneau, E., Dherin, C., Legrand, P., Tellier-Lebegue, C., Gilquin, B., Bonnesoeur, P., ... Charbonnier, J. (2013). Structure of the MutL $\alpha$  C-terminal domain reveals how Mlh1 contributes to Pms1 endonuclease site. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(4), 461–468. doi:10.1038/nsmb.2511



Guillotin, D. e, Martin, S. (2014). Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy. *Experimental Cell Research*, 329(1), 110–115. doi:10.1016/j.yexcr.2014.07.004

Hampel, H., Frankel, W., Panescu, J., Lockman, J., Sotamaa, K., Fix, D., ... Chapelle, A. (2006). Screening for Lynch Syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer ) among Endometrial Cancer Patients. *Cancer Research*, 66(15), 7810–7818. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1114

Heinen, C. (2016). Mismatch repair defects and Lynch syndrome: The role of the basic scientist in the battle against cancer. *DNA Repair*, 38, 127–134. doi:10.1016/j.dnarep.2015.11.025

Heinimann, K. (2013). Toward a Molecular Classification of Colorectal Cancer: The Role of MGMT. *Frontiers in Oncology*, 3(272), 1–7. doi:10.3389/fonc.2013.00266

Hsieh, P. e, Yamane, K. (2008). DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 129(7–8), 391–407. doi:10.1016/j.mad.2008.02.012

Jiricny, J. (2013). Postreplicative mismatch repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(4), 1–23. doi:10.1101/cshperspect.a012633

Johnson, R., Klassen, R., Prakash, L. e, Prakash, S. (2016). A major role of DNA polymerase  $\delta$  in replication of both the leading and lagging DNA strands. *Mol Cell*, 59(2), 163–175. doi:10.1016/j.molcel.2015.05.038.

Kastrinos, F. e, Stoffel, E. M. (2014). History, genetics, and strategies for cancer prevention in lynch syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 12(5), 715–727. doi:10.1016/j.cgh.2013.06.031

- Ladabaum, U., Wang, G., Terdiman, J., Blanco, A., Kuppermann, M., Boland, R., ... Phillips, K. (2011). Strategies to Identify the Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *Annals of Internal Medicine*, 155(2), 69–79. doi:10.7326/0003-4819-155-2-201107190-00002
- Lang, M. e, Gasche, C. (2017). Chemoprevention of Colorectal Cancer. *Europe PMC Funders Group*, 33(1), 58–67. doi:10.1159/000366037.Chemoprevention
- Levin, B., Lieberman, D. A., Mcfarland, B., Andrews, K. S., Brooks, D., Bond, J., ... Winawer, S. (2008). Screening and Surveillance for the Early Detection of Colorectal Cancer and Adenomatous Polyps, 2008 : A Joint Guideline From the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology. *Gastroenterology*, 134(5), 1570–1595. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.002
- Li, G. (2008). Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18(1), 85–98. doi:10.1038/cr.2007.115
- Lin, Z., Nei, M. e, Ma, H. (2007). The origins and early evolution of DNA mismatch repair genes - Multiple horizontal gene transfers and co-evolution. *Nucleic Acids Research*, 35(22), 7591–7603. doi:10.1093/nar/gkm921
- Liberti, S., Larrea, A. e, Kunkel, T. (2014). Exonuclease 1 Preferentially Repairs Mismatches Generated by DNA Polymerase  $\alpha$ . *DNA Repair*, 12(2), 92–96. doi:10.1016/j.dnarep.2012.11.001
- Liu, Q., Thompson, B., Ward, R., Hesson, L. e, Sloane, M. (2016). Understanding the Pathogenicity of Noncoding Mismatch Repair Gene Promoter Variants in Lynch Syndrome. *Human Mutation*, 37(5), 417–426. doi:10.1002/humu.22971
- Liu, D., Keijzers, G. e, Rasmussen, L. (2017). DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutation Research – Reviews*, 773, 174-187. doi:10.1016/j.mrrev.2017.07.001

Losso, G., Moraes, R., Gentili, A. e, Messias-Reason, I. (2012). Microsatellite instability - MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer. *ABCD: Brazilian Archives of Digestive Surgery*, 25(4), 240–244. doi:10.1590/S0102-67202012000400006

Lynch, P. (2017). History of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer or “Lynch Syndrome.” *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(4), 500–511. doi:10.1016/j.rmcl.2017.07.005

Modrich, P. (2016). Mechanisms in E. coli and Human Mismatch Repair. *Nobel Lecture*, 55(30), 8490–501. doi:10.1002/anie.201601412

Molinari, F., Signoroni, S., Lampi, A., Bertan, C., Perrone, F., Sala, P., ... Frattini, M. (2014) BRAF mutation analysis is a valid tool to implement in Lynch syndrome diagnosis in patients classified according to the Bethesda guidelines. *Tumori*, 100(3), 237-362. doi:10.1700/1578.17214

Munoz, J. (2017a). Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer.

Consultado em setembro de 2017

Disponível em <https://emedicine.medscape.com/article/188613-overview>

Munoz, J. (2017b). Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Treatment & Management.

Consultado em setembro de 2017

Disponível em <https://emedicine.medscape.com/article/188613-treatment#d14>

Nishant, K., Plys, A. e, Alani, E. (2008). A mutation in the putative MLH3 endonuclease domain confers a defect in both mismatch repair and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 179(2), 747–755. doi:10.1534/genetics.108.086645

Niv, Y. (2007). Microsatellite instability and MLH1 promoter hypermethylation in colorectal cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 13(12), 1767–1769. doi:10.3748/wjg.v13.i12.1767

Ozerov, S. S., Zakharov, I. V., Talypov, S. R., Konovalov, D. M., Kislyakov, A. N. e, Kachanov, D. Y. U. (2013). Turcot Syndrome . A Rare Case and Literature Review. *Burdenko Journal of Neurosurgery*, 77(3), 46–49. doi:10.1097/SGA.0000000000000101

Peltomäki, P. (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 1174–1179. doi:10.1200/JCO.2003.04.060

Peltomäki, P., Aaltonen, L., Sistonen, P., Pylkkänen, L., Mecklin, J.-P., Järvinen, H., ... Vogelstein, B. (1993). Genetic Mapping of a Locus Predisposing to Human Colorectal Cancer. *Science*, 260(5109), 810–813. doi:10.1126/science.8484120

Reyes, G., Schmidt, T., Kolodner, R. e, Hombauer, H. (2015). New insights into the mechanism of DNA mismatch repair. *Chromosoma*, 124(4), 443–462. doi:10.1007/s00412-015-0514-0

Rodriguez-Bigas, M., Boland, C., Hamilton, S., Henson, D., Jass, J., Khan, P., ... Srivastava, S. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(23), 1758–1762. doi:10.1093/jnci/89.23.1758

Rogacheva, M., Manhart, C., Chen, G., Guarne, A., Surtees, J. e, Alani, E. (2014). Mlh1-Mlh3, a meiotic crossover and DNA mismatch repair factor, is a Msh2-Msh3-stimulated endonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5664–5673. doi:10.1074/jbc.M113.534644

Rubenstein, J., Enns, R., Heidelbaugh, J. e, Barkun, A. (2015). American Gastroenterological Association Institute Guideline on the Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Gastroenterology*, 149(3), 777–782. doi:10.1053/j.gastro.2015.07.036

Shawki, S. e, Kalady, M. (2016). Recent advances in understanding Lynch syndrome. *F1000Research*, 5(F100mFaculty Rev), 2889. doi:10.12688/f1000research.9654.1

Sousa, R., Lage, P., Ferreira, S., Claro, I., Francisco, I., Filipe, B., ... Nobre-Leitão, C. (2007). Necessidade de novos critérios clínicos: Para a identificação de famílias com síndrome de lynch em base genética. *Acta Medica Portuguesa*, 20(6), 535–541.

Thibodeau, S., Bren, G. e, Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science (New York, N.Y.)*, 260(5109), 816–9. doi:10.1126/science.8484122

Vasen, H., Moslein, G., Alonso, A., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, ... Wijnen, J. (2007). Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *Journal of Medical Genetics*, 44(6), 353–362. doi:10.1136/jmg.2007.048991

Vasen, H. F. A., Blanco, I., Aktan-collan, K., Gopie, J. P., Alonso, A., Aretz, S., ... Möslin, G. (2013). Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*, 62(6), 812–823. doi:10.1136/gutjnl-2012-304356

Vasen, H., Ghorbanoghli, Z., Bourdeaut, F., Cabaret, O., Caron, O., Duval, A., ... Wimmer, K. (2014). Guidelines for surveillance of individuals with constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium “Care for CMMR-D” (C4CMMR-D). *Journal of Medical Genetics*, 51(5), 283–293. doi:10.1136/jmedgenet-2013-102238

Weissman, S., Bellcross, C., Bittner, C., Freivogel, M., Haidle, J., Kaurah, P., ... Daniels, M. (2011). Genetic Counseling Considerations in the Evaluation of Families for Lynch Syndrome — A Review. *National Society of Genetic Counselors*, 20, 5–19. <http://doi.org/10.1007/s10897-010-9325-x>

Wells, K. e, Wise, P. E. (2017). Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. *Surgical Clinics of North America*, 97(3), 605–625. doi:10.1016/j.suc.2017.01.009

Wolf, A., Buchanan, A. e, Farkas, L. (2013). Historical review of Lynch syndrome. *Journal of Coloproctology*, 33(2), 95–110. doi:10.1016/j.jcol.2013.04.004

Zakharyevich, K., Tang, S., Ma, Y. e, Hunter, N. (2012). Delineation of joint molecule resolution pathways in meiosis identifies a crossover-specific resolvase. *Cell*, 149(2), 334–347. doi:10.1016/j.cell.2012.03.023

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MLH1> - Consultado em outubro de 2017

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/PMS2> - Consultado em outubro de 2017

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH6> - Consultado em outubro de 2017

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSH2> - Consultado em outubro de 2017

<https://ghr.nlm.nih.gov/gene/EPCAM> - Consultado em outubro de 2017

## 6. Anexos

**Tabela 1 – Critérios de Amesterdão I para o diagnóstico de HNPCC**

1. Três ou mais familiares com CCR histologicamente confirmado, sendo um deles familiar em primeiro grau dos outros dois. FAP deve ser excluída;
2. Pelo menos duas gerações sucessivas com CCR;
3. Pelo menos um dos CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos de idade.

Adaptado de Brandão *et al.*, 2015.

**Tabela 2 – Critérios de Amesterdão I para o diagnóstico de HNPCC**

1. Três ou mais familiares com um tumor do espectro da SL histologicamente confirmado (CCR, endométrio, intestino delgado, ureter e pélvis renal), sendo um deles familiar em primeiro grau dos outros dois. FAP deve ser excluída;
2. Pelo menos duas gerações sucessivas afectadas;
3. Pelo menos um dos tumores diagnosticado em idade inferior a 50 anos de idade.

Adaptado de Brandão *et al.*, 2015.

**Tabela 3 – Critérios de Bethesda Revisitos**

1. Indivíduos com CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
2. Indivíduos com CCR sincronicos ou metacrónicos, ou associação com outros tumores do espectro da SL, independentemente da idade;
3. Indivíduos com CCR com características histológicas de instabilidade de alto grau (infiltrado linfocitário, reacção tipo Crohn, tumores mucinosos ou com diferenciação em “anel de sinete” ou padrão de crescimento medular) diagnosticado em idade inferior a 60 anos;
4. Indivíduos com CCR e um ou mais familiares em 1º grau com um tumor do espectro da SL, um dos quais diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
5. Indivíduos com CCR ou tumores associados a SL, e dois ou mais familiares de 1º e 2º grau com tumor do espectro da SL, independentemente da idade.

Adaptado de Brandão *et al.*, 2015.

**Tabela 4 – Recomendações para a avaliação de MSI-H e MSI-L**

O painel de microssatélites do National Cancer Institute (NCI) original incluiu BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S2507; no entanto, as seguintes advertências podem ser aplicadas:

1. Se apenas as repetições de nucleótidos forem mutadas, deve ser testado um painel secundário de marcadores de microssatélites com repetições de mononucleótidos (por exemplo, BAT40 e / ou MYCL) para excluir MSI-H;
2. As repetições de dinucleótidos são menos sensíveis do que as repetições de mononucleótidos para MSI-H; no entanto, eles fornecem um controle interno preventivo sobre a mistura de amostras;
3. Um painel de cinco repetições mononucleotídicas monomórficas pode ser mais sensível aos tumores MSI-H do que outros marcadores de microssatélites e pode evitar a necessidade de uma amostra de tecido normal como comparação; esta abordagem requer três ou mais alelos mutantes que indiquem MSI-H.

MSI-H – alta instabilidade de microssatélites em tumores refere-se a mudanças em dois ou mais dos cinco painéis de marcadores de microssatélites em tumores recomendados pelo National Cancer Institute.

MSI-L – baixa instabilidade de microssatélites em tumores refere-se a mudanças em apenas um dos cinco painéis de marcadores de microssatélites em tumores recomendados pelo NCI.

Adaptado de Wolf *et al.*, 2013.